

Title	Loss of SMAD4 Promotes Colorectal Cancer Progression by Accumulation of Myeloid-Derived Suppressor Cells through CCL15-CCR1 Chemokine Axis(Abstract_要旨)
Author(s)	Inamoto, Susumu
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2016-03-23
URL	https://doi.org/10.14989/doctor.k19560
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	ETD

京都大学	博士（医学）	氏名	稲本将
論文題目	Loss of SMAD4 Promotes Colorectal Cancer Progression by Accumulation of Myeloid-Derived Suppressor Cells through CCL15-CCR1 Chemokine Axis (大腸癌細胞のSMAD4欠損がCCL15-CCR1ケモカイン・シグナルを介して骨髄由来免疫抑制細胞(MDSC)を集簇させ癌浸潤を促進する)		
(論文内容の要旨) これまでに、大腸癌細胞において癌抑制遺伝子 SMAD4 の欠損がケモカイン CCL15 を発現誘導することで CCR1 陽性骨髄細胞を肝転移周囲に集簇させ、大腸癌肝転移が促進されることを報告した。しかし、大腸癌原発巣の癌浸潤における同現象の検証は未だ行われていない。今回の研究では、ヒト大腸癌細胞の同所性移植マウスモデル及び手術検体を用いたヒト大腸癌原発巣の検討で、大腸癌原発巣の浸潤過程における CCL15-CCR1 ケモカイン・シグナルの役割について検証した。 同所性移植マウスモデルの検討としては、ルシフェラーゼ発現ヒト大腸癌細胞株(Luc-HT29)に対し、レンチウイルスを用い、1)SMAD4 を強制発現させた安定細胞株、2)CCL15 を発現抑制させた安定細胞株をそれぞれ樹立し、免疫不全マウスの直腸粘膜下に癌細胞を注入する原発性大腸癌モデルを作成、原発巣の増大を経時的に計測した。ヒト大腸癌原発巣の検討では、当院で 2005～2008 年に原発巣切除術を受けた大腸癌患者 333 人の切除標本を用い、SMAD4、CCL15 及び CCR1 の免疫組織染色を行い、これらの関連性について検討した。さらに各種細胞マーカーと CCR1 との蛍光二重染色法を行い、原発巣浸潤先端に集簇する CCR1 陽性細胞の特性解析を行った。また、原発大腸癌患者 132 人の術前血清を用い、血中 CCL15 濃度を ELISA 法にて測定し、新規バイオマーカーとしての可能性についても検証した。 同所性移植マウスモデルでは、1)SMAD4 を強制発現させた株では CCL15 発現が減弱しコントロール群に比して有意に腫瘍増大が緩徐で、2) CCL15 を発現抑制させた株でもコントロール群に比して有意に腫瘍増大は緩徐であった。ヒト大腸癌原発巣切除標本の免疫組織染色では、SMAD4 欠損と CCL15 発現の間に有意な相関関係があり(P<0.01)、CCL15 陽性症例では陰性症例に比して約 2.2 倍多くの CCR1 陽性細胞が癌浸潤先端に集簇していた。Stage II/III のサブグループ解析では、CCL15 陽性症例の根治切除後における無病生存期間が陰性症例に比して短い傾向にあった(P=0.15)。また CCR1 陽性細胞の特性解析では、CCR1 陽性細胞は CD11b、CD33 を発現するも、HLA-DR、CD3、CD8、 α -SMA は発現しておらず、myeloid derived suppressor cell(MDSC:骨髄由来免疫抑制細胞)と考えられた。さらに CCR1 陽性細胞の多くは CD15 陽性の granulocytic-MDSC と(G-MDSC)であったが、一部は CD14 陽性の monocytic-MDSC(M-MDSC)であった。原発大腸癌患者の術前血清中 CCL15 濃度は非癌患者に比して有意に高値であった(17.8 \pm 7.9 vs 9.4 \pm 3.0 ng/ml ; P < 0.01)。 大腸癌原発巣においては、SMAD4 欠損により CCL15 発現が増加し、CCL15-CCR1 ケモカイン・シグナルを介して CCR1 陽性 G-MDSC が浸潤先端に集簇することで腫瘍浸潤が促進し、患者予後の悪化に繋がることが示唆された。CCR1 陽性 MDSC は大腸癌の新たな治療ターゲットになりえ、血中 CCL15 濃度は新規の大腸癌バイオマーカーになり得ると考えられた。			

(論文審査の結果の要旨)

ヒト大腸癌肝転移では癌抑制遺伝子SMAD4の欠損がケモカインCCL15を発現誘導しケモカインレセプターCCR1陽性細胞を転移巣周囲に集簇させ、転移が促進されることが報告されている。今回、申請者は大腸癌原発巣の浸潤におけるCCL15-CCR1シグナルの役割を細胞レベルで検証し、CCR1陽性細胞の細胞特性、さらにはCCL15の新規大腸癌バイオマーカーとしての可能性を検証した。

ルシフェラーゼ発現ヒト大腸癌細胞株(Luc-HT29)のSMAD4の強制発現、及びCCL15発現抑制の安定細胞株を用いた大腸癌同所性移植モデルの検討では、共にコントロール群に比べCCR1陽性細胞の集積は少なく腫瘍増大も有意に緩徐であった。原発大腸癌患者333人の切除標本免疫組織染色の検討では、SMAD4欠損とCCL15発現の間に有意な関連があり、CCL15陽性群では陰性群より約2.2倍多くのCCR1陽性細胞が浸潤先端に集積していた。またStage II/IIIではCCL15陽性群の無病生存期間が短い傾向にあった。蛍光二重染色による特性解析で、CCR1陽性細胞の多くはCD15陽性granulocytic MDSC(G-MDSC)と考えられた。さらに原発大腸癌患者の術前血清中CCL15濃度は非癌患者より有意に高値であった。以上より大腸癌原発巣でもSMAD4欠損により、CCL15-CCR1シグナルを介したCCR1陽性G-MDSCの浸潤先端部への集簇が腫瘍浸潤を促進し患者予後の悪化に繋がることが示唆された。CCR1陽性MDSCは大腸癌の新たな治療ターゲットに、血中CCL15濃度は新規の大腸癌バイオマーカーになり得ると考えられた。

以上の研究は大腸癌原発巣の浸潤転移に関する分子生物学的メカニズム解明に貢献し、大腸癌に対する新たな治療戦略の構築に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成27年12月18日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。